"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و پنجم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

DOR: 20.1001.1.23223243.2021.19.1.29.0

شناسایی لاین‌های برگرداننده باروری مناسب برای تولید برنج (*Oryza sativa* L.) هیبرید

Identification of suitable fertility restorer lines for development of hybrid rice (*Oryza sativa* L.)

حمیده مهدی‌خانی[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، نادعلی باقری[۳] و عمار افخمی قادی[۴]

چکیده

مهدی‌خانی، ح.، ق.ع. نعمت‌زاده، ن. باقری و ع. افخمی قادی. ۱۴۰۲. شناسایی لاین‌های برگرداننده باروری مناسب برای تولید برنج (*Oryza sativa* L.) هیبرید. **نشریه علوم زراعی ایران. ۲۵ (۱): ۱۹ -۱.**

از اولویت‌های اصلی در تولید برنج هیبرید، شناسایی لاین‌های برگرداننده باروری مناسب است. به‌منظور شناسایی لاین‌های برگرداننده باروری مناسب و ارزیابی برنج هیبرید، ۳۶ ژنوتیپ نسل اول از تلاقی دو لاین نرعقیم سیتوپلاسمی جلودارA و ندا‌A به عنوان لاین مادری با ۱۳ لاین از ارقام محلی و چهار لاین برگرداننده باروری خارجی به عنوان لاین پدری، طی دو سال ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان بدست آمده و در سال دوم، نتاج حاصل همراه با رقم ندا و جلودار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کشت شدند. نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفات نتاج نشان داد که بیشترین میزان باروری و عملکرد دانه متعلق به هیبریدهای H33، H30، H29، H28 و H27 بود که به‌ترتیب حاصل از تلاقی IR68078-15-2-1-2-2-R/JelodarA، IR68078-15-2-1-2-2-R/NedaA، IR65622-151-1-2-2-2R/JelodarA، IR65622-151-1-2-2-2R/NedaA و IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R/JelodarA بودند. از بین نشانگرهای ریزماهواره (RM 171، RM 490 و RM 3148) همبسته با ژن برگرداننده باروری *Rf3* و *Rf4* برای گزینش هیبریدهای برتر، نشانگر RM 3148 برای هیبریدهای حاصل از تلاقی ارقام پدری IR68078-15-2-1-2-2-R، IR65622-151-1-2-2-2R و IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R با لاین نرعقیم جلودار A دارای الگوی نواری مشابه شاهد برگرداننده باروری بود و هیبریدهای H27، H29 و H33 نیز دارای هر دو الگوی نواری، یعنی هتروزیگوت بوده و براساس این نشانگر احتمالا دارای ژن *Rf4rf4* بودند. نشانگر RM 171 نشان دهنده حضور احتمالی ژن *Rf4* را در لاین‌های IR68078-15-2-1-2-2-R و IR65622-151-1-2-2-2R بوده و هیبریدهای آن‌ها نیز هتروزیگوت بودند. براساس نتایج این تحقیق، بهترین رقم برگرداننده باروری برای نرعقیم نداA، لاین IR65622-151-1-2-2-2R و برای نرعقیم جلودارA لاین‌های IR68078-15-2-1-2-2-R و IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R بودند که از آن‌ها می‌توان در برنامه تولید برنج هیبرید استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: برنج هیبرید، عملکرد دانه، نرعقیمی سیتوپلاسمی، لاین‌های برگرداننده باروری و نشانگرهای ریزماهواره

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱ این مقاله مستخرج از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: hamidehmahdikhani0@gmail.com)
۲- استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان
۳- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- دانش آموخته دکتری تخصصی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، محقق پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان، به‌ویژه در کشورهای آسیایی است. با توجه به محدودیت‌هایی مانند شرایط نامساعد محیطی، آفات و بیماری‌ها، افزایش و پایداری تولید برنج یک چالش بزرگ محسوب می‌شود. فناوری برنج هیبرید یک راه حل موثر جهت افزایش عملکرد در واحد سطح است. در این فناوری از پدیده‌ی هتروزیس که برتری یک هیبرید (F_1) نسبت به والدین است، استفاده می‌شود. گزارش شده است که میانگین عملکرد برنج هیبرید ۲۰ تا ۲۵ درصد بیشتر از ارقام معمولی است (Kiani, 2015; Nematzadeh *et al*., 2006). برنج به عنوان یک گیاه خودگرده افشان، برای ایجاد هیبرید به یک سیستم نرعقیمی نیاز دارد و استفاده از پدیده‌ی نرعقیمی بالاخص نرعقیمی ژنتیکی - سیتوپلاسمی نقش موثری در تولید برنج هیبرید داشته است (Kiani, 2015; Afkhami Ghadi *et al*., 2015). نرعقیمی سیتوپلاسمی- ژنتیکی و روش برگرداندن باروری (CMS/RF) ابزارهای موثری برای بهره‌برداری از فناوری تولید برنج هیبرید هستند (Virmani and Wan, 1988). یکی از محدودیت‌های اصلی در اصلاح برنج هیبرید، محدود بودن تعداد لاین‌های برگرداننده باروری است. نتایج یک آزمایش (Nematzadeh and Kiani, 2010) جهت ارزیابی ژن‌های برگرداننده باروری برای نرعقیم‌های سیتوپلاسمی نوع عقیم وحشی (WA) از تلاقی نداA در سه لاین DN-32-6 ، DN-33-1 و DN-33-18 که حاصل از تلاقی از روش برگشتی- شجره‌ای سپید رود/ سنگ جو بودند، نشان داد که تنها تلاقی DN-33-18 در نداA بیش از ۸۰ درصد باروری در نسل F_1 داشت و نتایج ارزیابی مولکولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره وجود ژن‌های *Rf3* و *Rf4* را در والد DN-33-18 تایید کرد. عیدی کهنکی و همکاران (Eidi Kohanki *et al*., 2015) براساس نتایج ارزیابی مولکولی صورت گرفته روی لاین‌ها و ژنوتیپ‌های منتخب گزارش کردند که چهار نشانگر SSR همبسته با ژن‌های برگرداننده باروری، الگوی نواری مناسبی از نظر ژن‌های مورد نظر داشته و مشابه ژنوتیپ‌های شاهد بودند و یک نشانگر (RM 258) بعنوان یکی از نشانگرهای پیوسته با ژن‌های برگرداننده باروری شناخته شد. نشانگر RM 3148 نیز با ژن *Rf3* واقع برکروموزوم شماره یک لاین‌های برنج همبسته بود. علوی و همکاران (Alavi *et al*., 2009) نشانگر RM1 را در فاصله ۶/۵ سانتی مورگان از جایگاه ژنی *Rf3* روی کروموزوم شماره یک برنج مکان‌یابی کردند. نعمت‌زاده و کیانی (Nematzadeh and Kiani, 2010) نیز نشانگرهای RM 171، RM 258 را برای Rf4 و نشانگر RM 3148 را برای *Rf3* در ارقام ایرانی نقشه‌یابی کردند. آن‌ها گزارش کردند که لاین‌های R5،R7، R9، R28 و R45 دارای پتانسیل مناسبی جهت برگرداندن باروری هستند. در سیستم نرعقیمی ژنتیکی سیتوپلاسمی یا روش سه لاینی که مبتنی بر نرعقیمی ژنی و سیستم برگرداننده باروری است، شامل: لاین نرعقیم (CMS) یا (لاین A)، لاین نگهدارنده یا (لاین B) و لاین برگرداننده باروری یا (لاین R) است که برای تولید تجاری هیبریدهای برنج استفاده می‌شوند. لاین نرعقیم حاوی عوامل کنترل‌کننده نرعقیمی (S) در سیتوپلاسم و آلل‌های مغلوب (rf) از ژن‌های برگرداننده باروری در هسته می‌باشند. لاین نگهدارنده با لاین (CMS) از این جهت که دارای ژن‌های مشابه هسته‌ای بوده و تنها در عامل سیتوپلاسمی (N) با یکدیگر متفاوت می‌باشند، ایزولاین هستند (Bharaj *et al*., 1991). حفظ خلوص ژنتیکی لاین (A) از طریق تلاقی با لاین خالص (B) و تولید بذر خالص هیبرید از طریق تلاقی آن با لاین خالص (R) امکان‌پذیر است (Nematzadeh and Tariz, 2002).

هدف از این پژوهش شناسایی لاین‌های نرعقیمی سیتوپلاسمی- ژنتیکی و لاین‌های برگرداننده باروری جهت تولید لاین‌های جدید برای استفاده در تولید بذر برنج هیبرید بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل نتاج حاصل از تلاقی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی شامل ندا A (Nematzadeh *et al*., 2006) و جلودار A با ۱۳ لاین موتانت نسل دهم (M_{10}) شامل نعمت، دشت، پژوهش، فجر، سپیدرود، آمل۳، دم‌سیاه، طارم دیلمانی/ سنگ طارم، حسن سرایی/ سنگ طارم/ آمل۳ بودند. لاین‌های موتانت که از طریق پرتودهی با دوز ۲۰۰ گری اشعه گاما از منبع کبالت ۶۰ در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران ایجاد شده بودند، در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان وابسته به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شده و بعد از ده نسل خودگشنی، ابتدا با روش بالک تک بذر و سپس با روش شجره ای، بر اساس خصوصیات مطلوب مورفوژیک و زراعی گزینش شدند. لاین‌های یاد شده همراه با چهار ژنوتیپ برگرداننده باروری دریافت شده از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI)، با هدف شناسایی منابع جدید لاین‌های برگرداننده باروری و نگهدارنده نرعقیمی در آزمایشی که در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، وابسته به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری طی دو سال (۱۳۹۸ و ۱۳۹۹) اجرا شد، مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های نداA و جلودارA با توجه به وضعیت سیتوپلاسمی و ژن‌های نگهدارنده، بعد از هفت تلاقی برگشتی با لاین‌های نرعقیم بین‌المللی دارای ژن‌های نرعقیم بودند و در این پژوهش از این دو رقم نگهدارنده به عنوان والد مادری استفاده شد (Babaeian Jelodar *et al*., 2005; Nematzadeh *et al*., 2006; Afkhami Ghadi *et al*., 2019) و بعد از تلاقی لاین‌های پدری (به عنوان لاین‌های برگرداننده باروری) با لاین‌های نرعقیم نداA و جلودارA (به عنوان لاین مادری) برای حفظ خلوص ژنتیکی لاینA اقدام به تلاقی این لاین با لاین خالصB نیز شد. در بهار سال ۱۳۹۸ بذرهای ارقام والدینی بعد از ضدعفونی سطحی در ظروف پتری جوانه‌دار شده و سپس در خزانه پوشش‌دار رویانده شدند. گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی (۲۵ تا ۳۰ روز بعد از بذر پاشی)، در دو تاریخ (با فاصله دو هفته) در مزرعه در کرت‌هایی به ابعاد ۲×۲ با فاصله ۲۵ سانتی‌متر به‌صورت تک بوته نشاء شدند. عملیات داشت طبق توصیه‌های کارشناسی و عرف منطقه انجام شد. در شروع مرحله گلدهی پس از تأیید عقیمی لاین‌های نرعقیم با آزمون دانه گرده با محلول ید یدور پتاسیم یک درصد (Virmani *et al*., 1997)، بوته‌های نرعقیم با لاین نگهدارنده مربوطه تلاقی داده شدند. برای این کار در روز اجرای تلاقی، خوشه‌های لاین‌های پدری که حدود دو سوم آن‌ها خارج شده بودند از بوته‌ها جدا شده و سپس در ساعت ۱۲ تا ۱۴ دانه‌های گرده این خوشه‌ها، روی بوته‌های نرعقیمی که گلچه‌های آنها با قیچی به صورت اریب بریده شده بودند، گرده‌افشانی شدند. خوشه‌های تلاقی داده شده جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از ورود دانه‌های گرده بیگانه با کاغذ سلوفان پوشانده شدند. بذرهای F_1 حاصل از تلاقی لاین‌های والدینی حدود ۳۰ روز پس از تلاقی برداشت و نگهداری شدند. در سال دوم (۱۳۹۹) کلیه F_1های حاصل همراه با والدین در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه کشت شدند. صفات زراعی و مورفولوژیک شامل درصد عقیمی و باروری دانه‌های گرده، تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، تعداد پنجه‌های بارور، طول خوشه (سانتی‌متر)، تعداد دانه پر در خوشه، تعداد کل دانه در خوشه، وزن هزار دانه (گرم)، باروری خوشه و عملکرد دانه (گرم در بوته) براساس دستورالعمل موسسه بین المللی تحقیقات برنج اندازه‌گیری شدند (IRRI, 2013). گروه بندی دانه های گرده و خوشه با نرعقیمی کامل (صفر درصد باروری) نرعقیمی نسبی (یک تا ۳۰ درصد) باروری نسبی

جدول ۱- اسامی و شجره ژنوتیپ‌های پدری و مادری (لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی) برنج مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Names and pedigree of paternal and maternal rice genotypes (cytoplasmic sterile lines)

کد Code	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes	Pedigree	شجره	عملکرد دانه Grain yield (ton.ha^{-1})	کد Code	ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes	شجره Pedigree		عملکرد دانه Grain yield (ton.ha^{-1})
1	P10-88–37	Nemat mutant	موتانت نعمت	5.47	11	P14-1	Dasht mutant	موتانت دشت	2.22
2	P8-7-2-1-7-3-1-1	Domsiah mutant	موتانت دمسیاه	5.75	12	P15-6	Pajouhesh mutan	موتانت پژوهش	6.52
3	P8-7-2-1-4-2-1-1	Domsiah mutant	موتانت دمسیاه	5.75	13	P15-2	Pajouhesh mutant	موتانت پژوهش	9.24
4	P8-3-2-1-1-1-1	Domsiah mutant	موتانت دمسیاه	4.84	14	IR68078-15-2-1-2-2-R	Foreign restorer lines	لاین برگرداننده باروری خارجی	5.99
5	P9-7-6-3-1-3-1	Fajr mutant	موتانت فجر	5.61	15	IR65622-151-1-2-2-2R	Foreign restorer lines	لاین برگرداننده باروری خارجی	8.66
6	P9-8-1-1-1	Fajr mutant	موتانت فجر	6.41	16	IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R	Foreign restorer lines	لاین برگرداننده باروری خارجی	8.25
7	P9-7-1-1-1-1	Fajr mutant	موتانت فجر	5.61	17	NSIC RC 434	Foreign restorer lines	لاین برگرداننده باروری خارجی	4.65
8	P11-6-2-1-1-1-1	Sepidroud mutant	موتانت سپیدرود	6.84	18	Jelodar جلودارB	Tarom Deilamani/Sang Tarom	طارم دیلمانی/سنگ طارم	6.93
9	P12-5-3-3-2-2-1	Amol3 mutant	موتانت آمل۳	7.32	19	Neda نداB	Hasan Saraii/Sang Tarom/Amol3	حسن‌سرایی/سنگ‌طارم/آمل۳	8.20
10	P12-5-3-3-2-1-1	Amol3 mutant	موتانت آمل ۳	7.80					

P8: Domsiah, P9: Fajr, P11: Sepidroud, P12: Amol 3, P14: Dasht, P15: Pajouhesh, P10: Nemat

P8: دمسیاه، P9: فجر، P11: سپیدرود، P12: آمل ۳، P14: دشت، P15: پژوهش، P10: نعمت

جدول ۲- آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در ارزیابی مولکولی ژنوتیپ‌های برنج

Table 2. SSR primers used in molecular assessment of rice genotypes

نشانگرهای ریزماهواره SSR markers	توالی رفت Forward primer	توالی برگشتی Reverse primer	مکان کروموزومی Chromosomal location	ژن برگرداننده باروری Gene linkage	منبع Source
RM490	ATCTGCACACTGCAAACACC	AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG	1	*Rf3*	(Temnykh *et al*., 2001) (Lu *et al*., 2005) (Singh *et al*., 2013) (Mallikarjuna *et al*., 2013) (Sattari *et al*., 2007)
RM3148	GACTATTGCTCGAACACTTTG	TTGTCTTGCTTTGGTATTTGC	1	*Rf3*	(McCouch *et al*., 2002) (Jahani et al., 2014)
RM171	AACGCGAGGACACGTACTTAC	ACGAGATACGTACGCCTTTG	10	*Rf4*	(Bazrkar *et al*., 2008) (Lu *et al*., 2005)

(۳۰-۸۰ درصد) و باروری کامل (بیش از ۸۰ درصد) در نظر گرفته شدند (IRRI, 2013). تجزیه واریانس و مقایسات میانگین به وسیله نرم‌افزار SPSS و باروش توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. از روش تجزیه خوشه‌ای جهت تعیین فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از الگوریتم Ward و ضریب مربع فاصله اقلیدسی بعد از استاندارد کردن به روش Z اسکوئر به کمک نرم‌افزار NTSYS استفاده شد. تجزیه داده‌های مولکولی براساس الگوهای نواری حاصل از هر نشانگر به‌صورت امتیازدهی یک حضور و صفر عدم حضور انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس F_1های حاصل از تلاقی لاین‌های نرعقیم جلودارA و نداA با لاین‌های پدری از نظر کلیه صفات مورد بررسی، نشان داد که در کلیه صفات اختلاف بسیار معنی‌داری وجود داشت که بیانگر تنوع بین F_1های مورد ارزیابی بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که دامنه تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، ۱۰۰ درصد گلدهی و رسیدگی ژنوتیپ‌های برنج به‌ترتیب ۳۷، ۶۷/۶ و ۳۱/۳ روز بود. ژنوتیپ P15-6 با ۱۱۸/۳ روز، زودرس‌ترین و کلیه ژنوتیپ‌های خارجی با دوره رسیدگی ۱۵۰ روز (از بذرپاشی در خزانه تا رسیدگی فیزیولوژیک) دیررس‌ترین بودند. رسیدگی دو رقم نگهدارنده عقیمی جلودار و ندا نیز تقریباً همزمان بود (به‌ترتیب ۱۳۱ و ۱۳۵ روز). در تولید برنج هیبرید همزمانی در مراحل فنولوژیک اهمیت زیادی دارد، زیرا دو والد مادری و پدری باید دارای همزمانی گلدهی باشند تا حداکثر بذر تشکیل شود. میانگین ارتفاع بوته لاین‌های خارجی ۱۱۳/۱سانتی‌متر و برای تلاقی با رقم ندا مناسب بود. تعداد پنجه‌های بارور ژنوتیپ‌های خارجی مانند لاین‌های موتانت-IR86403 5-5-2-1-1-1-1-1R نسبت به لاین‌های موتانت بیشتر بود. بلندترین طول خوشه مربوط به لاین موتانت -P8-7 2-1-7-3-1-1 (۳۲/۵ سانتی‌متر) بود که دارای تعداد دانه پر بیشتر (۱۵۵ دانه) نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود. طول خوشه بلندتر و زیاد بودن تعداد دانه در خوشه که نشان دهنده ظرفیت بالاتر مخزن لاین یاد شده است، با قدرت بالاتر منبع (طول برگ پرچم ۵۰/۸ میلی‌متر) همراه بود. طول خوشه لاین‌های موتانت بیشتر از لاین‌های خارجی بود. لاین‌های برگرداننده باروری خارجی تعداد دانه بیشتری نسبت به لاین‌های موتانت داشتند، اما تعداد دانه‌های پوک بیشتری نیز داشتند. بیشترین طول دانه (۱۱/۱۷ میلی‌متر) مربوط به لاین موتانت P9-7-1-1-1-1 بود که عرض دانه آن نیز کوتاه (۱/۷۹ میلی‌متر) بود. لاین‌های برگرداننده باروری خارجی دانه کوتاه‌تری نسبت به سایر لاین‌ها (۱۰/۳۵میلی‌متر) و دو رقم نگهدارنده (۱۰/۸ میلی‌متر) داشتند. لاین موتانت -P8-7 2-1-7-3-1-1 بیشترین میزان باروری خوشه (۹۲/۷ درصد) را داشت. بیشترین وزن هزار دانه متعلق به لاین موتانت P11-6-2-1-1-1-1 (۳۰/۴ گرم) بود و طول و عرض دانه آن بیشتر بود. بیشترین میزان عملکرد دانه ژنوتیپ‌ها (۷۰۰ گرم در مترمربع) مربوط به ندا، IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R، P8-7-2-1-4-2-1-1، P12-5-3-3-2-1-1 و P12-5-3-3-2-2-1 بود که دلیل آن بالا بودن تعداد پنجه بارور، تعداد خوشه بارور، وزن هزار دانه و باروری خوشه بود (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین صفات والدین و نتاج F_1 نشان داد که دامنه تغییرات تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی و رسیدگی ژنوتیپ‌ها به‌ترتیب ۳۲/۶ و ۳۶/۳ روز بود. تلاقی H4 (M7-15-2/NedaA) با ۹۱ روز، زودرس‌ترین و طول دوره رویش سایرنتاج ۱۱۶ تا ۱۲۷ روز (بذرپاشی در خزانه تا رسیدگی فیزیولوژیک) بود. رسیدگی دو رقم نرعقیم جلودار و ندا نیز تقریباً همزمان بود (به‌ترتیب ۱۲۳ و ۱۲۷ روز). در تولید برنج هیبرید گلدهی دو والد نرعقیم و برگرداننده باروری باید همزمان باشد تا امکان تولید بذر فراهم شود. دامنه تغییرات ارتفاع بوته نتاج F_1 از ۹۸ تا ۱۴۹/۶ سانتی‌متر

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات گیاهی ژنوتیپ‌های والدینی برنج

Table 3. Mean comparison of plant traits of parental rice genotypes

ژنوتیپ‌های برنج Rice genotypes	روز تا رسیدگی Days to maturity	ارتفاع بوته Plant height (cm)	طول خوشه Panicle length (cm)	دانه پر در خوشه Filled grain.panicle^{-1}	تعداد کل دانه در خوشه Total grain.panicle^{-1}	باروری خوشه Panicle fertility (%)	عملکرد دانه Grain yield (g.m^{-1})
P10-88-37	128.0de	96.6k	26.3g-j	133.8a-c	161.4c-e	83.0a-d	579.7b-f
P8-3-2-1-1-1-1	125.6f-h	141.1a	32.5a	152.0a	193.0a-c	78.6c-e	456.1d-f
P8-7-2-1-4-2-1-1	125.0i	137.0b	24.2j	90.2d	97.5g	92.6a	704.7a-c
P8-7-2-1-7-3-1-1	126.0e-g	138.3ab	26.4g-j	114.6a-d	141.8d-f	81.0b-d	513.7c-f
P9-7-1-1-1-1	128.0de	110.6g-i	28.3e-g	124.3a-d	135.1d-f	91.6a	626.2a-e
P9-7-6-3-1-3-1	124.0h	131.3c	29.8b-f	107.5b-d	137.2d-f	78.3c-e	407.0fg
P9-81-1-1	125.0gh	126.5d	29.5c-f	117.5a-d	152.2d-f	77.0de	697.3a-c
P11-6-2-1-1-1-1	131.6c	133.5c	26.4g-j	105.5cd	116.8fg	90.0ab	686.5a-c
P12-5-3-3-2-1-1	129.0d	112.3f-h	28.5d-g	125.1a-d	142.8d-f	87.6a-c	726.7a-c
P12-5-3-3-2-2-1	128.0de	120.5e	31.2b-d	141.6a-c	174.1b-d	81.3b-d	711.5a-c
P14-1	127.3d-f	115.6f	31.7ab	149.5a	215.7a	69.3ef	224.4g
P15-2	118.3j	108.3i	27.6f-i	133.5a-c	156.6c-f	84.6a-d	797.6ab
P15-6	128.0de	101.5j	26.3g-j	107.5b-d	122.3e-g	87.6a-c	687.5a-c
IR65622-151-1-2-2-2R	150.0a	113.1fg	25.3hj	133.56a-c	202.4ab	66.0f	671.6a-d
IR680078-15-2-1-2-2R	150.0a	109.6hi	30.5b-e	145.7ab	220.2a	65.3f	593.9a-f
IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R	150.0a	114.6f	24.8ij	120.0a-d	218.2a	54.6g	813.3a
NSIC RC 434	150.0a	115.1f	28.0e-h	103.8c-d	155.2c-f	67.3f	392.6a-f
Jelodar جلودار	131.3c	138.3ab	28.8d-g	139.7a-c	161.3c-e	87.3a-c	450.5ef
Neda ندا	135.0b	113.1fg	26.4g-j	114.4a-d	145.3d-f	78.3c-e	817.3a
Total کل	131.8	119.8	28.0	124.2	160.5	79.0	608.3

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Tukey's test

بـود. ارتفـاع بوتـه لایـن نـرعقیم نـدا A ۹۸ و جلـودار A ۱۱۰/۳ سانتی‌متر بود که در گرده‌افشانی بـا لایـن پـدری باید به این موضوع توجه شود تا حـداکثر گـرده‌افشـانی صورت گیـرد. تعـداد پنجـه‌هـای بـارور نتـاج F_1 از ۸/۶ تا ۲۷/۳ بـود کـه نشان دهنـده تنـوع ظرفیـت پنجـه‌زنـی نتاج است. بلندترین طول خوشه مربـوط بـه تلاقـی H12 (M9-P8-7-2-1-4-2-1-1/.NedaA) (۳۳/۲ سـانتی‌متـر) بود. بیشترین تعداد دانه پر در خوشه متعلق به تلاقی‌هـای H28، H34، H27، H30 و H29 (بـه‌ترتیـب ۱۷۷/۲، ۱۶۱/۸، ۱۵۵/۱، ۱۴۶/۷ و ۱۴۱ دانه در خوشه) بـود و دو تلاقـی H28 و H34 (IR86403-5-5-2-1-1-1-1-IR) دارای بیشترین تعداد کل دانه نیز بودند. طول دانـه نتـاج F_1 از ۹/۶ تا ۱۱/۲۷ میلی‌متر بود. بیشترین میزان بـاروری خوشـه متعلـق بـه H28، H34، H27، H33، H30 و H29 (بیش از ۸۰ درصد) بود. بیشترین وزن هـزار دانـه متعلـق به H4 (M7-15-2/NedaA) (۲۹/۸ گـرم) بـود و طـول و عـرض دانـه آن بیشـتر بـود. بیشـترین میـزان عملکـرد هیبریدها (۴۴ گرم در بوته معادل ۷۰۰ گرم در مترمربع) به‌ترتیب مربوط بـه H30، H27، H28، H29، H34 و H32 بود کـه دلیـل آن بـالا بـودن تعـداد پنجـه بـارور، تعـداد خوشه بارور، وزن هزار دانه و باروری خوشـه بـود. ایـن هیبریدها بعنوان برترین هیبریدها همـراه بـا والـدین‌شـان انتخـاب شـدند (جـدول ۴). در آزمـایش پیشـنماززاده امـامی و همکـاران (Pishnamazzadeh Emami *et al.*, 2020) نیز گـزارش شـده اسـت کـه وزن نهـایی دانـه بـر عملکرد دانه تاثیرگذار است.

ژنوتیـپ‌هـای بـرنج مـورد مطالعـه در دنـدروگرام حاصل از تجزیـه خوشـه‌ای (کلاسـتر)، در چهـار گـروه اصـلی قـرار گرفتنـد (شـکل ۱). گـروه اول شـامل ۵۳ درصـد ژنوتیـپ‌هـای مـورد مطالعـه همـراه بـا رقـم نـرعقیم نـدا و جلـودار بودنـد کـه بزرگتـرین گـروه را تشـکیل دادنـد. گـروه دوم ۲۲ درصـد ژنوتیـپ‌هـا را شـامل شـدند. گـروه سـوم بـا تنهـا چهـار هیبریـد کوچک‌ترین گروه را تشکیل دادند. این گـروه بـا بـیش از ۶۰ گرم در هر بوته دارای بیشترین میزان عملکرد دانه بـود کـه بـه دلیـل خـروج کامـل خوشـه (۹۳/۶)، دارای بیشـترین تعـداد دانـه پـر در خوشـه (۱۶۰/۲)، بیشـترین وزن هزار دانه (۲۷/۳ گرم)، بیشترین تراکم دانه (۶/۶۱) و بیشـترین میـزان بـاوری دانـه گـرده (۸۴/۶ درصـد) و خوشـه (۸۳/۱ درصـد) بودنـد. ایـن گـروه پرمحصول‌تـرین ژنوتیـپ‌هـای F_1 بودنـد. گـروه چهـارم نیز ۲۵ درصد بقیه ژنوتیپ‌هـا را دربرگرفـت. سـروتی و همکـاران (Sruthi *et al.*, 2020) در ارزیـابی تنـوع مورفولـوژیکی ۹۶ لایـن بـرنج بـا اسـتفاده از تجزیـه خوشه‌ای آنها را در پنج گروه اصلی و ۱۳ گـروه فرعـی تقسیم بندی کردند. در آزمایش آنها لاین‌هـای والـدین در گـروه‌هـای B (گـروه نگهدارنـده) و R (گـروه برگرداننـده بـاروری) قـرار گرفتنـد. در آزمایشـی کـه روی ۱۶۷ نوع برنج ایتالیـایی انجـام شـد، ارزیـابی تنـوع ژنتیکـی بـا نشـانگرهای ریزمـاهواره نشـان داد کـه از بین ۴۹ نشانگر، ۱۳ نشانگر چندشـکلی مناسـبی داشـتند. نتـایج حاصـل از ترسـیم درخـت فیلـوژنتیکی نشـان داد کـه مجموعـه ژنوتیـپ‌هـا بـه دو گـروه عمـده تقسـیم و بعنوان زیر گونـه‌هـای ژاپنیکـا و اینـدیکا طبقـه بنـدی شدند. گروه ژاپنیکا، به دو زیر گـروه ژاپنیکـای معتـدل و ژاپنیکای گرمسیری تقسـیم شـد (Pathaichindachote *et al.*, 2019).

نتایج حاصل از تجزیه مولکولی با نشانگر RM 3148 برای هیبریدهای حاصل از تلاقی ارقام پدری -IR68078-15-2-1-2-2-R، IR65622-151-1-2-2-2R، -IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R با لاین نـرعقیم جلـودار A، چندشـکلی واضحی را در بین ژنوتیپ‌های شاهد نرعقیم جلودار A و شـاهد برگرداننـده بـاروری IR67924R نشـان داد (شکل ۲). رقم شـاهد نـرعقیم (جلـودار A) در محـدوده ۱۶۶ جفـت‌بـاز و رقـم شـاهد بـین‌المللـی IR67924R دارای الگـوی نـواری ۱۴۰ جفـت‌بـاز و دارای ژن Rf_3 بود. ژنوتیـپ‌هـای پـدری IR68078-15-2-1-2-2-R، IR 5622-151-1-2-2-2R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات گیاهی نتاج F_1 های برنج حاصل از تلاقی لاین‌های نرعقیم جلودارA و نداA با لاین‌های پدری

Table 4. Mean comparison of plant traits of rice F_1 resulting from crossing the sterile lines of JelodarA and NedaA with the paternal lines

نتاج F_1	تلاقی‌ها Crosses	روز تا ۵۰ درصد گلدهی Day to 50% flowering	روز تا رسیدگی Day to maturity	ارتفاع بوته Plant height (cm)	پنجه بارور در بوته Fertile tiller.plant^{-1}	طول خوشه Panicle length (cm)	دانه پر در خوشه Filled grain.panicle^{-1}	دانه پوک در خوشه Unfilled grain.panicle^{-1}
H1	M7-P14-1/JelodarA	92f	120.0f	117.6hi	16.3b-h	31.4a-e	7.3pq	184.8a
H2	M7-P14-1/NedaA	82l	120.0f	100.6m	17.0b-f	31.0b-f	48.5k-m	117.3hi
H3	M7-P15-2/JelodarA	81m	121.3e	126.0fg	17.0b-f	29.7d-h	64.3ij	96.3i-k
H4	M7-P15-2/NedaA	91a	113.6h	112.0j-l	13.6g-m	29.2e-i	105.0ef	47.6n-p
H5	M7-P15-6/JelodarA	83k	124.0c	122.0gh	12.3k-n	29.1f-i	12.5o-q	132.1f-h
H6	M7-P15-6/NedaA	85i	116.6g	110.6j-l	18.6bc	32.5ab	97.4fg	85.5j-l
H7	GM8-N-88-37/jelodarA	84j	122.0e	113.5i-l	16.0b-i	27.5i-k	9.3pq	157.0b-f
H8	GM8-N-88-37/NedaA	82l	127.0a	99.0m	14.3e-l	27.6h-k	26.1no	129.1gh
H9	P8-R5/JelodarA	95d	127.0a	139.6c-e	13.0i-m	32.1a-c	9.1pq	174.8a-c
H10	P8-R5/NedaA	90g	127.0a	143.5bc	9.3no	32.9ab	0.66q	180.1ab
H11	P8-15/JelodarA	95d	127.0a	146.6ab	12.3k-n	31.2a-f	42.2lm	134.1e-h
H12	P8-15/NedaA	88h	127.0a	143.3bc	15.3d-k	33.2a	48.5k-m	113.8hi
H13	P8-22/JelodarA	92f	116.0g	149.6a	12.6j-m	32.1a-c	101.7f	75.2k-m
H14	P8-22/NedaA	83k	127.0a	147.6ab	15.6c-j	31.6-ad	73.8hi	104.6ij
H15	P9-R4/JelodarA	82l	127.0a	117.3hi	11.6l-n	29.2e-i	14.8o-q	141.6d-g
H16	P9-R4/NedaA	88h	127.0a	109.6l	15.3d-k	30.0c-g	45.4lm	101.6ij
H17	P9-10/JelodarA	88h	120.0f	141.3c-e	11.3l-o	30.3c-g	109.3ef	58.8m-o
H18	P9-10/NedaA	88h	117.0g	124.0g	12.6j-m	30.0c-g	111.8ef	45.0op
H19	P9-11/JelodarA	88h	122.0e	124.0g	13.3h-m	29.8d-g	37.1mn	143.0d-g
H20	P9-11/NedaA	88h	127.3a	118.0hi	18.0b-d	29.2e-i	20.4op	151.3c-g
H21	P11-R4/JelodarA	90g	127.0a	125.0g	18.0b-d	29.4e-i	7.2pq	164.4a-d
H22	P11-R4/NedaA	88h	127.0a	111.6j-l	11.0m-o	28.6g-j	44.3lm	100.9ij
H23	P12-R3/JelodarA	88h	127.0a	114.0i-l	17.0b-f	28.1g-k	61.7i-k	84.5j-l
H24	P12-R3/NedaA	88h	116.6g	110.0l	17.6b-d	25.0l	84.6gh	65.3l-o
H25	P12-R4/JelodarA	88h	121.0ef	115.0i-l	8.6o	28.8g-j	5.4pq	147.8d-g
H26	P12-R4/NedaA	94e	123.3cd	111 jkl	19.0b	30.23c-g	50.2j-m	114.7hi
H27	IR68078-15-2-1-2-2-R/JelodarA	94e	125.6b	136.0e	14.0f-m	29.2e-i	155.1bc	31.3p
H28	IR68078-15-2-1-2-2-R/NedaA	94e	127.0a	121.3gh	17.0b-f	31.2a-f	177.1a	80.0j-m
H29	IR65622-151-1-2-2-2-R/JelodarA	94e	125.3b	137.6d-f	16.6b-g	29.8d-g	141.0d	35.0p
H30	IR65622-151-1-2-2-2-R /NedaA	94e	127.3a	111.6j-l	17.3b-e	26.3kl	146.7cd	32.0p
H31	NSICRC434/JelodarA	98c	125.0b	130.6fg	18.3b-d	31.2a-f	57.1j-l	70.6l-n
H32	NSICRC434/NedaA	98c	127.0a	115.66jk	16.6b-g	30.2c-g	97.5fg	74.0k-m
H33	IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R/JelodarA	99b	117.0g	126.3fg	11.6l-n	26.7j-l	118.7e	23.8p
H34	IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R/nedaA	88h	127.0a	116.0i-k	12.6j-m	28.7g-j	161.8b	32.0p
H35	JelodarA/JelodarB	94e	123.0d	110.3l	13.6g-m	28.1g-k	0.0q	161.2ad
H36	NedaA/ NedaB	90e	127.0a	98.0m	27.3a	26.9j-l	0.0q	158.1b-e

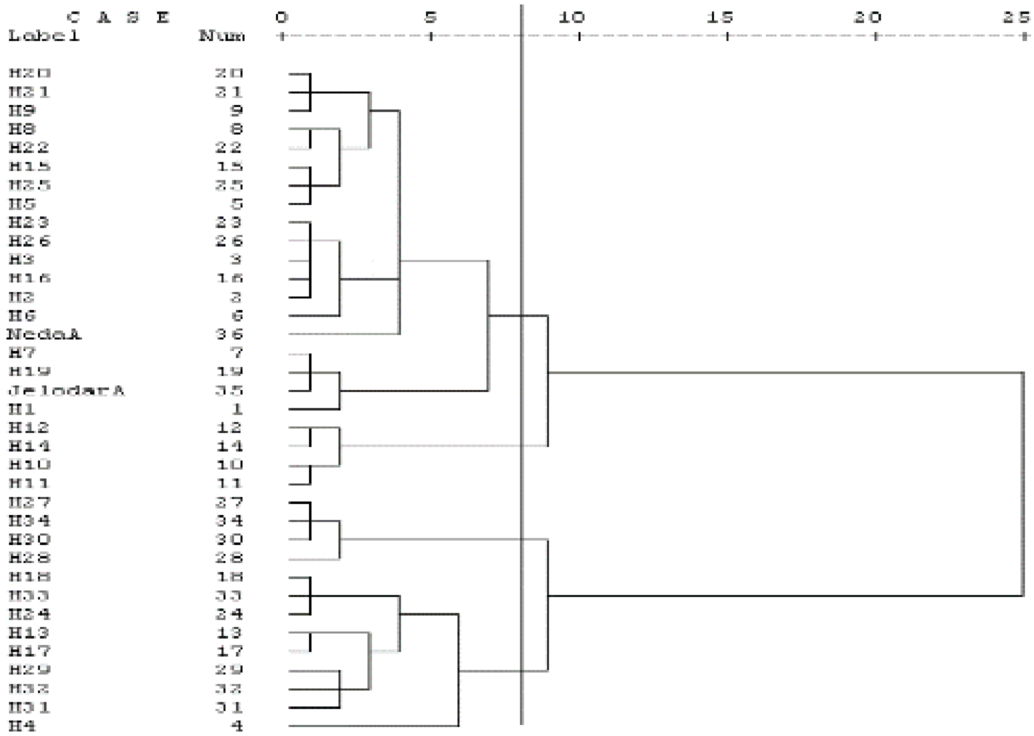
Table 4. Continued

ادامه جدول ۴

نتاج F1	تلاقی‌ها Crosses	طول دانه Grain length (mm)	عرض دانه Grain width (mm)	تعداد کل دانه در خوشه Total grain.panicle^{-1}	وزن هزار دانه 1000 grain weight (g)	عملکرد دانه Grain yield (g.plant^{-1})
H1	M7-P14-1/JelodarA	11.26a	1.94lm	192.2ab	23.6j-m	5.7k-n
H2	M7-P14-1/NedaA	10.72be	2.03i-l	165.3c-k	26.8e-h	21.8i
H3	M7-P15-2/jelodarA	10.99ab	2.13e-j	160.6d-k	25.8f-j	27.5g-i
H4	M7-P15-2/NedaA	10.47b-g	2.25a-d	152.66 ik	29.8a	42.3e
H5	M7-P15-6/JelodarA	10.46b-g	2.21a-e	144.6kl	23.4k-m	8.2j-l
H6	M7-P15-6/NedaA	10.18f-j	2.26a-c	183.0cd	25.2g-l	38.2e-f
H7	GM8-N-88-37/JelodarA	10.31c-g	1.87m	166.3c-k	23.7j-m	10.7j-k
H8	GM8-N-88-37/NedaA	10.07g-k	2.20a-f	155.2g-k	27.0d-h	13.5j
H9	M9-P8-3-2-1-1-1-1/JelodarA	10.39c-g	2.04h-l	184.0b-d	26.8e-h	12.1jk
H10	M9-P8-3-2-1-1-1-1/NedaA	10.58b-g	2.25a-d	180.7b-e	27.7a-f	0.41n
H11	M9-P8-7-2-1-4-2-1-1/JelodarA	9.78h-k	2.15d-h	176.3b-i	26.5e-i	15.2j
H12	M9-P8-7-2-1-4-2-1-1/NedaA	9.60k	2.23a-e	162.4d-k	26.8e-h	23.4hi
H13	M9-P8-7-2-1-7-3-1-1/JelodarA	10.52b-g	2.13e-j	177.0b-h	24.4i-m	30.4gh
H14	M9-P8-7-2-1-7-3-1-1/NedaA	9.756i-k	2.21a-f	178.5b-i	26.9e-h	40.9ef
H15	M9-P9-7-1-1-1-1/JelodarA	10.59b-g	2.00k-l	156.5f-k	23.3k-m	4.8k-n
H16	M9-P9-7-1-1-1-1/NedaA	10.69b-f	2.17b-g	147.1kl	27.2c-g	22.0i
H17	M9-P9-7-6-3-1-3-1/JelodarA	10.67b-f	1.99kl	168.1c-k	22.8mn	29.4gh
H18	M9-P9-7-6-3-1-3-1/NedaA	10.56b-g	2.17c-g	156.8e-k	28.8a-e	41.8e
H19	M9-P9-1-1-1/JelodarA	10.49b-g	1.89m	180.1b-f	23.0lm	11.4jk
H20	M9-P9-1-1-1/NedaA	10.38c-g	2.05h-l	171.7b-j	26.2f-i	9.5j-l
H21	M9-P11-6-2-1-1-1-1/JelodarA	10.74b-d	2.13e-i	171.6b-j	27.0d-h	3.4l-n
H22	M9-P11-6-2-1-1-1-1/NedaA	10.06g-k	2.20a-f	145.3kl	29.4a-c	14.4j
H23	M9-P12-5-3-3-2-1-1/JelodarA	10.26d-i	2.02j-l	146.3kl	25.1g-l	29.6gh
H24	M9-P12-5-3-3-2-1-1/NedaA	10.48 -b-g	2.23a-e	150.0j-l	28.6a-e	40.9ef
H25	M9-P12-5-3-3-2-2-1/JelodarA	10.66b-f	2.18b-f	153.3h-k	24.4i-m	5.6k-n
H26	M9-P12-5-3-3-2-2-1/NedaA	10.29c-h	2.07g-k	165.0c-k	27.0d-h	29.2gh
H27	IR68078-15-2-1-2-2-R /JelodarA	10.09g-k	2.25a-d	186.5bc	27.3b-g	60.2b
H28	IR68078-15-2-1-2-2-R/NedaA	9.73jk	2.23a-e	211.6a	24.9h-m	56.5bc
H29	IR65622-151-1-2-2-2/JelodarA	10.07g-k	2.01k-l	173.6b-j	25.0m	54.3bc
H30	IR65622-151-1-2-2-2/NedaA	10.08g-k	2.103f-k	178.7b-i	27.6a-f	74.6a
H31	NS IC RC434/Jelodar	10.55c-g	2.19a-f	127.8l	25.4f-k	34.4fg
H32	NS IC RC434/NedaA	10.2e-j	2.29a	171.5b-j	29.2a-d	43.2e
H33	IR86403-5-5-2-1-1-1-1-IR /JelodarA	10.54b-g	2.20a-f	144.2kl	29.4a-c	44.77 df
H34	IR86403-5-5-2-1-1-1-1-IR /NedaA	10.49b-g	2.28ab	193.8ab	29.5a-b	50.1cd
H35	JelodarA/JelodarB	10.82a-c	1.78n	161.2d-k	20.9n	0.0n
H36	NedaA/ NedaB	10.20e-j	2.14d-h	158.1e-k	24.2i-m	0.0n

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Tukey’s test



شکل ۱- خوشه‌بندی F_1های برنج حاصل از تلاقی لاین‌های نرعقیم جلودارA و نداA با لاین‌های پدری به روش وارد و ضریب فاصله اقلیدسی

Fig. 1. Clustering of rice F_1 resulting from crossing of sterile lines JelodarA and NedaA with paternal lines based on Ward's method and Euclidean distance coefficient

دارای الگوی نواری پیوسته با ژن *Rf3* و مشابه شاهد برگرداننده باروری بوده و هیبریدهای حاصل (H27، H29 و H33) دارای هر دو الگوی نواری (هتروزیگوت) و براساس این نشانگر دارای ژن *Rf3rf3* بودند. کیانی و همکاران (Kiani *et al*., 2015) در شناسایی ارقام برگرداننده و نگهدارنده باروری در برنج با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (RM 3148، RM 258 و RM 171) گزارش دادند که ارقام هاشمی، سپیدرود و دیلمانی دارای ژن برگرداننده باروری *Rf_3* بودند و پیشنهاد دادند که می‌توان از آن‌ها در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی برنج هیبرید استفاده کرد. ریواتی و همکاران (Revathi *et al*., 2020) برای انتقال ژن *Rf_3* به رقم Swarna که دارای ژن Rf_4 بود از چند نشانگر از جمله RM3148 برای تشخیص ژن *Rf_3* در جمعیت حاصل از تلاقی استفاده کردند.

نتایج حاصل از نشانگر RM 3148 نشان داد که رقم شاهد نرعقیم نداA و رقم شاهد بین‌المللی IR67924R دارای ژن *Rf_3* بودند و بقیه ارقام والدینی و هیبریدهای حاصل الگوی نواری مشابه الگوی نواری شاهد نرعقیم داشتند (شکل ۳). نعمت‌زاده و کیانی (Nematzadeh and Kiani, 2010) در مطالعه ژن‌های برگرداننده باروری برای نرعقیمی سیتوپلاسمی نوع WA درلاین DN-33-18، با تلاقی رقم نرعقیم نداA با سه لاین اصلاح شده و با استفاده از نشانگر RM 3148، میزان باروری دانه‌های گرده در تلاقی ندا با لاین DN-33-18 را بیش از ۸۰ درصد گزارش کردند.

جدول ۵- میانگین صفات گیاهی گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای F_1 های برنج حاصل از تلاقی لاین‌های نرعقیم جلودار A و ندا A با لاین‌های پدری

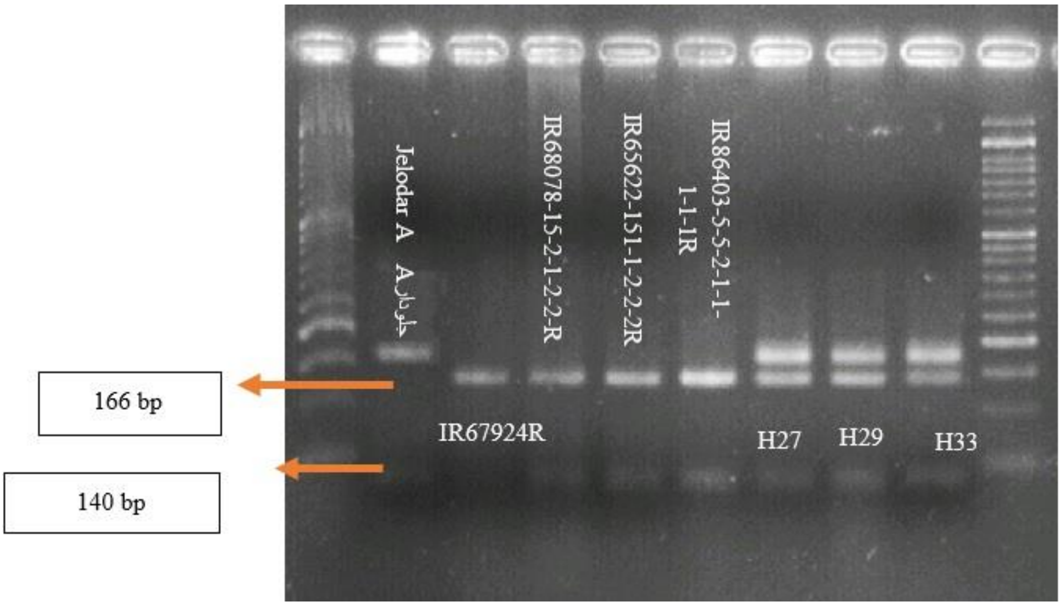
Table 5. Mean of plant traits of clusters of F_1 rice resulting from crossing the sterile lines of Jelodar A and Neda A with the paternal lines

گروه Group	روز تا ۵۰ درصد گلدهی Day to 50% flowering	روز تا رسیدگی Day to maturity	ارتفاع بوته Plant height (cm)	طول خوشه Panicle length (cm)	خروج خوشه از غلاف Panicle exertion (%)	دانه پر در خوشه Filled grain.panicle^{-1}	دانه پوک در خوشه Unfilled grain.panicle^{-1}
1.0	87.6	124.0	114.9	29.4	80.8	29.5	134.0
2.0	89.0	127.0	145.2	32.2	79.8	41.3	133.2
3.0	92.5	126.7	121.2	28.9	93.6	160.2	43.8
4.0	95.4	117.2	127.4	29.4	84.5	103.0	55.0
Total	90.3	122.9	122.1	29.7	83.0	63.7	104.1

ادامه جدول ۵

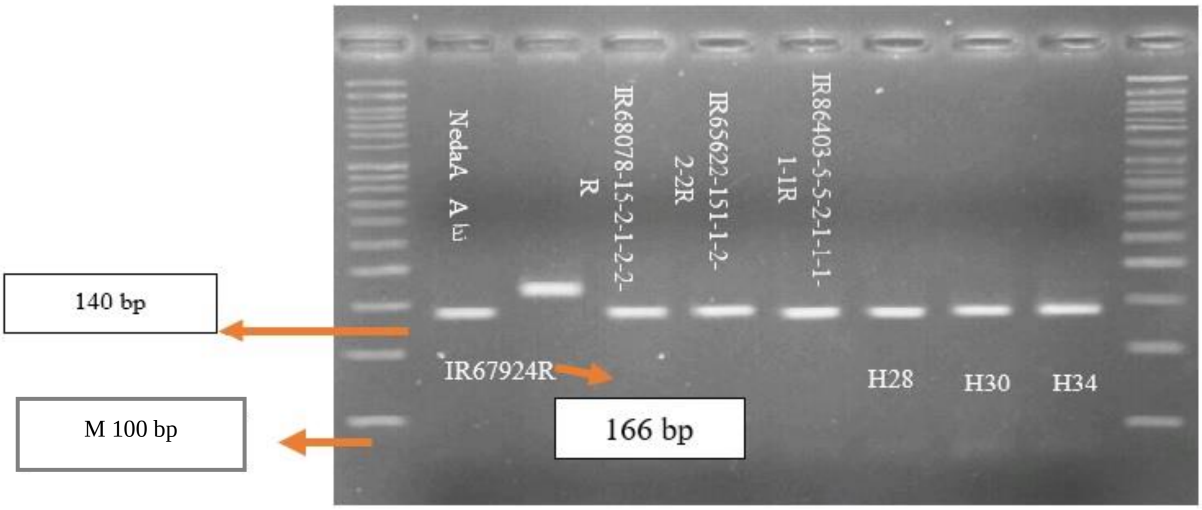
Table 5. Continued

گروه Group	تعداد کل دانه در خوشه Total grain.panicle^{-1}	طول دانه Grain length (mm)	عرض دانه Grain width (mm)	نسبت طول به عرض دانه Grain length:width	وزن هزار دانه 1000 grain weight (g)	تراکم دانه (تعداد دانه در طول خوشه) (cm) Grain density	باروری دانه گرده Pollen grain fertility (%)	باروری خوشه Panicle fertility (%)	عملکرد دانه Grain yield (g.plant^{-1})
1.0	163.5	10.51	2.07	5.09	25.2	5.5	13.9	18.4	14.1
2.0	174.5	9.93	2.21	4.49	27.0	5.4	21.9	23.9	19.9
3.0	192.7	10.10	2.22	4.56	27.3	6.6	84.6	83.1	60.4
4.0	157.9	10.45	2.16	4.84	27.0	5.4	66.2	64.9	40.2
Total	166.6	10.38	2.13	4.90	26.1	5.6	35.7	37.8	26.4



شکل ۲- الگوی نواری نشانگر RM 3148 برای ارقام والدینی و هیبریدهای برنج حاصل از تلاقی با لاین نرعقیم جلودارA

Fig. 2. Band pattern of RM3148 marker for parental rice cultivars and hybrids resulting from crossing with sterile JelodarA line



شکل ۳- الگوی نواری نشانگر RM 3148 برای ارقام والدینی و هیبریدهای برنج حاصل از تلاقی با لاین نرعقیم نداA

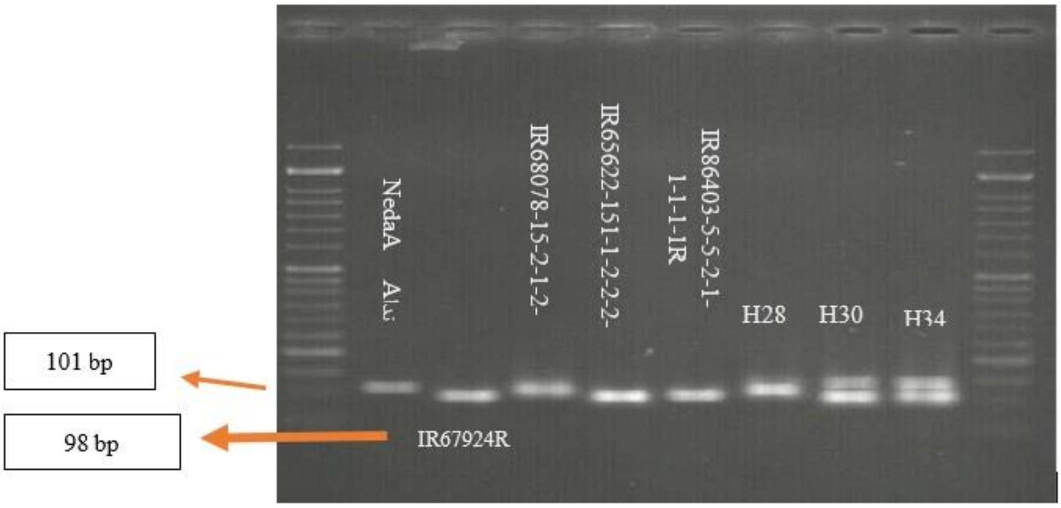
Fig. 3. Banding pattern of RM3148 marker for parental rice cultivars and hybrids resulting from crossing with sterile NedaA line

نتایج حاصل از تجزیه مولکولی با نشانگر RM 490 (همبسته با ژن Rf_3)، چندشکلی واضحی را در بین ژنوتیپ‌های شاهد نرعقیم نداA و برگرداننده باروری IR67924R نشان داد (شکل ۴). ظهور الگوی نواری در

محدوده‌ی ۱۰۱ جفت بازی بود. بر این اساس رقم شاهد نرعقیم (نداA) در محدوده ۱۰۱ جفت باز و رقم شاهد بین‌المللی IR7924R دارای الگوی نواری ۹۸ جفت‌باز بودند و دارای ژن Rf_3 هستند.

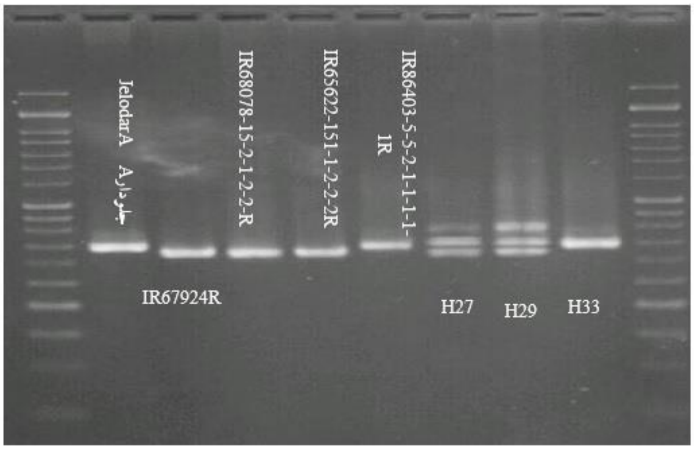
ارقام والدینی IR68078-15-2-1-2-2R الگوی نواری مشابه با رقم شاهد نرعقیم ندا و ارقام IR65622-151-1-2-2-2R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R الگوی نواری مشابه با رقم شاهد IR67924 بوده و هیبرید H28 هم الگو با رقم ندا و هیبریدهای H30 و H34 هم الگو با رقم شاهد IR67924 و به صورت هتروزیگوت بودند (شکل ۵). بابائیان جلودار و همکاران (Babaeian Jelodar *et al.*, 2012) در مطالعه مکان‌یابی ژن‌های برگرداننده باروری در برنج گزارش کردند که نشانگر RM 490 نه تنها نوارهای چندشکلی بین نشانگر IR 8899 و آمل ۲ داشت، بلکه پیوستگی بالایی با ژن‌های برگرداننده باروری نیز داشته و اظهار شد که این نشانگر جهت استفاده در برنا مه گزینش به کمک نشانگر برای لاین‌های برگرداننده باروری در سیستم CMS-WA بسیار موثر است. در آزمایش قلی‌زاده و همکاران (Gholizadeh *et al.*, 2014)، لاین IR67924R برای کلیه تلاقی‌ها به عنوان لاین برگرداننده باروری شناسایی شد. در مقابل تلاقی والد Rome با Amol3A and NedaA (CMS5، NematA، ChampaA) کمترین مقدار باروری را داشتند. در تجزیه مولکولی با استفاده از نشانگرهای RM 490 ژن *Rf* تنها در والد IR67924R شناسایی شد. این والد در تلاقی با CMS ها بیش از ۸۰ درصد باروری داشت.

نتایج نشان داد که نشانگر RM 171 در فاصله ۶/۳ سانتی‌مورگان و پیوسته با ژن Rf_4، قرار دارد (شکل ۶). نعمت‌زاده و کیانی (Nematzadeh and Kiani, 2012) مبنی بر چند شکلی ایجاد شده بانشانگر RM 171 بین لاین نرعقیم جلودار A و لاین شاهد IR67924R و سه لاین والدینی IR65622-151-1-2-2-2R، IR68078-15-2-1-2-2-R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R همراه با سه هیبرید حاصل از تلاقی لاین‌های والدینی و جلودارA نشان داد که ژنوتیپ‌های IR68078-15-2-1-2-2-R و IR65622-151-1-2-2-2R دارای ژن Rf_4 بودند و هیبریدهای آن‌ها نیز به‌صورت هتروزیگوت این ژن را بروز داده و رقم IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R الگوی نواری مشابه با الگوی نواری جلودار داشت.



شکل ۴- الگوی نواری نشانگر RM 490 برای ارقام والدینی و هیبریدهای برنج حاصل از تلاقی با لاین نرعقیم نداA

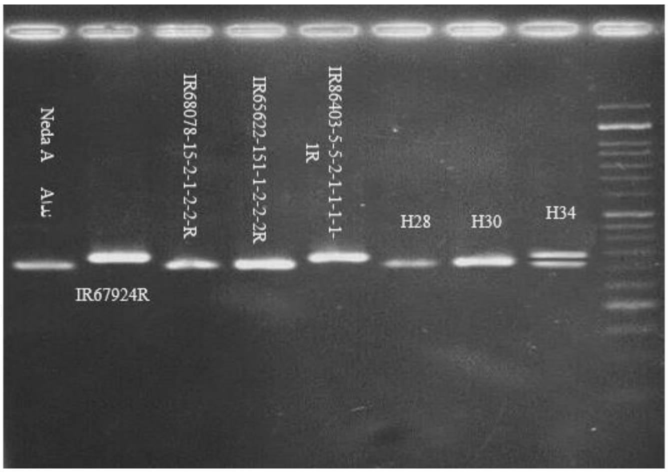
Fig. 4. Banding pattern of RM 490 marker for parental rice cultivars and hybrids resulting from crossing with sterile NedaA line



شکل ۵- چندشکلی ایجاد شده با نشانگر RM 171 بین لاین نرعقیم جلودار A و لاین شاهد IR67924R و سه لاین والدینی -IR65622 151-1-2-2-2R، IR68078-15-2-1-2-2-R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1R همراه با سه هیبرید حاصل از تلاقی لاین‌های والدینی و جلودارA

Fig. 5. Polymorphism of RM 171 marker between the sterile JelodarA line and the control line IR67924R and the three parental lines IR65622-151-1-2-2-2R, IR68078-15-2-1-2-2 -R, IR86403-5-5-2-1-1-1-1R, along with three hybrids resulting from the crossing of parental lines and JelodarA

چند شکلی ایجاد شده با نشانگر RM 171 بین لاین نرعقیم ندا A و لاین شاهد IR67924R و سه لاین والدینی IR65622-151-1-2-2-2R، IR68078-15-2-1-2-2-R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1R همراه با سه هیبرید حاصل از تلاقی لاین‌های والدینی و ندا A نشان داد که ژنوتیپ IR86403-5-5-2-1-1-1-1R الگوی نواری مشابه الگوی نواری IR67924R داشت (شکل۶). در آزمایش کیانی (Kiani, 2012) اعتبار سنجی نشانگرهای راپید برای تشخیص ژن‌های برگرداننده باروری Rf در ژنوتیپ‌های برنج، رقم ندا به عنوان نگهدارنده عقیمی گزارش شد.



شکل ۶- چند شکلی ایجاد شده با نشانگر RM 171 بین لاین نرعقیم نداA و لاین شاهد IR67924R و سه لاین والدینی -IR65622-151 1-2-2-2R، IR68078-15-2-1-2-2-R، IR86403-5-5-2-1-1-1-1R به همراه سه هیبرید حاصل از تلاقی لاین‌های والدینی و نداA

Fig. 6. Polymorphism of RM 171 marker between NedaA line and control line IR67924R and three parental lines IR65622-151-1-2-2-2R, IR68078-15-2-1-2- 2-R, IR86403-5-5-2-1-1-1-1R along with three hybrids resulting from crossing of parental lines and NedaA

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که از میان ژنوتیپ‌های برنج، بهترین برگرداننده باروری با ویژگی‌های زراعی مطلوب سه لاین IR8640-3-5-5-2-1-1-1-1-1R، IR65622-151-1-2-2-2R و IR68078-15-2-1-2-2-R بودند که به دلیل بالا بودن تعداد پنجه بارور، تعداد خوشه بارور، وزن هزاردانه و باروری بالای خوشه انتخاب شدند. بهترین هیبریدها با بیشترین میزان عملکرد (بیش از ۷۰۰ گرم در مترمربع) به‌ترتیب شامل H33، H30، H29، H28 و H27 بودند که به دلیل بیشترین میزان باروری خوشه (بیش از ۸۰ درصد) و بالا بودن تعداد پنجه بارور، تعداد خوشه بارور و وزن هزاردانه بالا انتخاب شده و درنتیجه بهترین لاین‌های نرعقیم شامل ندا و جلودار برای هیبریدهای H30، H29، H28 و H27 بهترین انتخاب بودند و تنها برای هیبرید H33 بهترین نرعقیم جلودار شناسایی شد. نتایج حاصل از نشانگر RM 3148 برای هیبریدهای حاصل از تلاقی ارقام پدری IR68078-15-2-1-2-2-R، IR65622-151-1-2-2-2R، با لاین نرعقیم IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R جلودارA نشان داد که ارقام پدری دارای الگوی نواری مشابه شاهد برگرداننده باروری بودند و هیبریدهای حاصل (H27، H29 و H33) از تلاقی (IR86403-5-5-2-1-1-1-1-IR/ Jelodar , IR65622-151-1-2-2-2/Jelodar , IR68078-15-2-1-2-2-R/Jelodar) نیز دارای هر دو الگوی نواری یعنی هتروزیگوت بوده و براساس این نشانگر دارای ژن *Rf4rf4* بودند. نتایج مربوط به نشانگر RM 171 نشان داد که ژنوتیپ‌های IR68078-15-2-1-2-2R و IR65622-151-1-2-2-2R دارای ژن *Rf4* بودند و هیبریدهای آن‌ها نیز به صورت هتروزیگوت این ژن را بروز دادند. از ارقام برگرداننده باروری شناسایی شده IR68078-15-2-1-2-2-R، IR65622-151-1-2-2-2R و IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R در این تحقیق می‌توان در برنامه تولید برنج هیبرید استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مجموعه مدیریت و کارکنان پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان بابت در اختیار قرار دادن امکانات پژوهشی مورد نیاز این تحقیق تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Afkhami Ghadi, A., Babaeian Jelodar, N. A. and Bagheri N. A. 2015. Evaluation of sterility stability for some of rice cytoplasmic male sterile lines. *Journal of Crop Breeding*, 7(15), pp.14-23. [In Persian]. http://dor.org/20/1001. 1.22286128.1394.7.15.2.2

Afkhami Ghadi, A., Khdemian, R., Nematzadeh, Gh.A. and Jelodar Babaeian, N. A. 2019. Identification of Male Sterile *Seed and Plant Journal*, 35-1(2), pp.121-135. [In Persian]. http://doi.org/10.22092/sppi.2019.121907

Alavi, M., Ahmadikhah, A., Kamkar, B. and Kalateh, M. 2009. Mapping *Rf3* locus in rice by SSR and CAPS markers. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1(7), pp.121-126. http://doi.org/10.5897/IJGMB.9000041

Jahani, M., Nematzadeh, Gh. A. Dolatabadi, B. Hashemi., H and Mohammadi-Nejad G. 2014. Identification and validation of funcitional markers in a global rice collection by association mapping. *Genome*, 57(6), 355-362. http://doi.org/10.1139/gen-2014-0044

Babaeian Jelodar, N. A., Bagheri, N. A., Pasha, A. and Afkhami Ghadi, A. 2012. Molecular mapping of the fertility restorer genes for WA-type CMS in hybrid rice. 12th Iranian Genetics Congress Symposium, Jan. 25, 2012, Shaid Beheshti University, Tehran, Iran. [In Persian]. https://civilica.com/doc/226779/

Babaeian Jelodar, N. A., Bagheri, N. and Nattaj, E. 2005. Development of new Iranian male sterile and restorer lines for developing three-line rice hybrid and quality of hybrid rice. 5th International Rice Genetics Symposium and 3rd International Rice Functional Genetics Symposium, Nov. 19-23, 2005, Manila, Philippines.

Bazrkar, L., Ali, A. J., Babaeian, N. A., Ebadi, A. A., Allahgholipour, M. and Kazamitabar, K. 2008. Tagging of four fertility restorer loci for wild abortive- cytoplasmic mail sterility system in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers. *Euphytica*, 164(3), pp. 669-677. http://doi.org/10.1007/s10681-008-9667-8

Bharaj, T. S., Bains, S. S. and Gagneja, M. R. 1991. Genetics of fertility restoration of wild abortive cytoplasmic male sterility in rice. (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 56(3), pp.199-203. http://doi.org/10.1007/bf00042364

Nematzadeh, Gh. A. and Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for WA type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), pp.6273-6277. http://doi.org/10.5897/AJB10.396

Eidi Kohanki, M., Kiani, G. and Nematzadeh, Gh. A. 2015. Morphological and molecular selection of fertility restorer gene(s) in segragating populations of rice. *Plant Production* (*Scientific Journal of Agriculture*), 38(2), pp.89-98. [In Persian]. http://doi.org/10.22055/ppd.2015.11322

Gholizadeh Ghara, A., Nematzadeh, Gh. A., Bagheri, N. A., Oladi, M. and Bagheri, A. 2014. Heritability and heterosis of agronomic traits in rice lines. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(1), pp.66-70.

IRRI. 2013. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. http://www.knowledgebank.irri.org/images/docs/rice-standard-evaluation-system.pdf

Kiani, G. 2012. Evaluation of genetic distances of rice cultivars using RAPD markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(4), pp.165-173. [In Persian]. http://doi.org/10.22103/JAB.2014.1229

Kiani, G. 2015. Validation of SSR markers linked to restoring fertility (*Rf*) genes and genotyping of rice lines at *Rf* Loci. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17: pp.1931-1938. http://dor.org/20.1001.1.16807073.2015.17.7.18.1

Kiani, G. 2018. Identification of fertility restoring and maintenance cultivars in rice using SSR marker. J*ournal of Plant Production*, 40(1), pp.81-86. [In Persian]. http://doi.org/10.22055/ppd.2016.12363

Lu, H., Redus, M. A., Coburn, JR., Rutger, J. N., McCouch, S. R. and Tai, T. H. 2005. Population structure and breeding patterns of 145 us rice cultivars based on SSR marker analysis. *Crop Science*, 45(1), pp.66-67. http://doi.org/10.2135/cropsci2005.0066

Mallikarjuna, B. P., Shivakumar, N., Hitalmani, S., Prahalada, G.D., Lohithaswa, H. C. and Krishnappa,

M. P. 2013. Validation of SSR markers linked to fertility rest oration in rice (*Oryza sativa* L.). *Research on Crops*, 14(2), pp.324-329.

McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., K, Clare, Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. and Xing, Y. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9, 257-279. http://doi.org/10.1093/dnares/9.6.199

Nematzadeh, Gh. A. Ali, A. J., Sattari, M., Valizadeh, A., Alinejad, E. and Nouri, M. Z. 2006. Relationship between different allogamic associated trait characteristics of the five newly developed cytoplasmic male sterile (CMS) lines in rice. *Journal of Central European Agriculture*, 7(1), pp.49-56. https://jcea.agr.hr/en/issues/article/317

Nematzadeh, Gh. A. and Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for WA- type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), pp. 6273-6277. http://doi.org/10.5897/AJB10.396

Nematzadeh, Gh. A. and Kiani, G. 2012. Tagging of fertility-restoring genes in Iranian restorer rice promising line DN-33-18. *Agronomy Journal* (*Pajouhesh & Sazandegi*), 25(1), pp.95-103. [In Persian]. https://www.sid.ir/paper/214916/fa

Nematzadeh, Gh. A. and Tariz, A. 2002. Hybrid Rice Seed Production. Mazandaran University Publications. [In Persian]. https://www.adinehbook.com/gp/product/9646433332.

Pathaichindachote, W., Panyawut, N., Sikaewtung, K., Patarapuwadol, S. and Muangprom, A. 2019. Genetic diversity and allelic frequency of selected Thai and exotic rice germplasm using SSR markers. *Rice Science*, 26(6), pp.393-403. http://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.11.002

Pishnamazzade Emami, M., Ebadi, A. A., Mohibalipour, N., Nourafkan, H. and Ajali, J. 2020. Grouping rice recombinant inbred lines using cluster and principal component analysis methods. *Cereal Research*, 10(1), pp.1-17. [In Persian]. http://doi.org/10.22124/cr.2020.16522.1602

Revathi, P., Singh, A. K., Sundaram, R. M and Neeraja, C.N. 2020. Conversion of partial restorer Swarna into restorer by transferring fertility restorer *Rf* gene(s) through marker assisted back cross breeding (MABB) in rice. Scientific Reports, 10(1). http://doi.org/10.1038/s41598-020-58019-1

Sattari, M., Kathiresan, A., Glenn, B. G. and Virmani, S.S. 2007. Comparative genetic analysis and molecular mapping of fertility restoration genes for WA, Disisi and Gambica cytoplasmic male sterility systems in rice. *Euphytica*, 160(3), pp.305-315. http://doi.org/10.1007%2Fs10681-007-9498-z

Singh, V., Panwar, G. S., Singh, J. 2013. Validation of SSR markers for fertility gene in drought tolerant advanced breeding lines of rice (*Oryza sativa* L). *Crop Research*, 45(1,2&3), pp.66-77. https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/49757/1/Validation

**Sruthi, K., Divya, B. P., Senguttuvel, P., Revathi, K. B., Kemparaju, P., Koteswararao, P., Sundaram, R., Singh, V., Ranjith Kumar, E., Bhowmick, P., Vinod. K., Gopala Krishnan, S., Singh, A. and Hari

Prasad, A. S. 2020. Evaluation of genetic diversity of parental lines for development of heterotic groups in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(2), pp.236-252. http://doi.org/10.1007/s13562-019-00529-9

Temnykh, S., DeClerek, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhoour, S. and McCouch, SR. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellite in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome Research*, 11(8), pp.1441-1452. http://doi.org/10.1101/gr.184001

Virmani, S. S. and Wan, B. H. 1988. Development of CMS Lines in Hybrid Rice Breeding, *In:* Hybrid rice, Proceedings of the International Symposium on Hybrid Rice, 6-10 Oct. 1986, Changsha, Hunan, China. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. http://books.irri.org/9711042088_content.pdf

Virmani, S. S., Viraktamath, B. C., Casal, C. L., Toledo, R. S., Lopez, M. T. and Manola, J. O. 1997. Hybrid Rice Breeding Manual: HR2 01. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. http://books.irri.org/9712201031_content.pdf

Identification of suitable fertility restorer lines for development of hybrid rice (*Oryza sativa* L.)

Mahdikhani. H.[1], Gh. Nematzadeh[2], N. Bagheri[3], A. Afkhami Ghadi [4]

ABSTRACT

Mahdikhani. H., Gh. Nematzadeh, N. Bagheri, A. Afkhami Ghadi. 2023. Identification of suitable fertility restorer lines for development of hybrid rice (*Oryza sativa* L.)**. Iranian Journal of Crop Sciences. 25(1): 1-19. (In Persian).**

One of the main priorities of using heterosis for development of hybrid rice is to identify the suitable fertility restorer lines. Therefore, to identify suitable fertility restorer lines and evaluate rice hybrids, 36 F_1 hybrids developed from crossing of two cytoplasmic male sterile lines, JelodarA and NedaA, together with 13 lines from local cultivars and four foreign fertility restorer lines as paternal lines as well as JelodarA and NedaA, as second crop, using randomized complete block design in three replications in the research farm of Tabaristan Genetics and Agricultural Biotechnology Research Institute, Sari, Iran, in 2019 and 2020. Mean comparison of morphological traits of F_1 hybrids showed that the highest fertility and grain yield belonged to H28, H27, H33, H30 and H29 hybrids, which was mainly due to high fertile tiller number, 1000-grain weight and high panicle fertility. Using SSR molecular markers including RM 171, RM 490 and RM 3148 associated with the fertility restorer genes *Rf3* and *Rf4* for selection of superior hybrids revealed that RM 3148 marker could identify superior hybrids resulted from crossing of paternal lines IR68078-15-2-1-2-2-R, IR65622-151-1-2-2-2R and IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R with male sterile JelodarA which had similar band as fertility control restorer line and H27, H29 and H33 hybrids. These hybrids had both bands i.e. heterozygous, and based on this marker they carry *Rf4rf4* alleles. RM 171 marker also showed the likely presence of *Rf4* gene in IR 68078-15-2-1-2-2-R and IR 65622-151-1-2-2-2-R lines and hybrids developed from them. The F_1 hybrids had both alleles in heterozygous from *Rf4rf4*. The results of this experiment showed that IR65622-151-1-2-2-2R was the suitable fertility restorer line for NedaA cytoplasmic male sterile, and IR68078-15-2-1-2-2-R and IR86403-5-5-2-1-1-1-1-1R were suitable fertility restorer lines for JelodarA cytoplasmic male sterile. These fertility restorer lines and cytoplasmic male sterile genotypes can be used in hybrid rice development programs.

Key words: Cytoplasmic male sterility, Fertility restorer lines, Grain yield, Hybrid rice and SSR markers

Received: March, 2023 Accepted: June, 2023

1. Former MSc Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran (Corresponding author) (Email: hamidehmahdikhani0@gmail.com)
2. Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Tabaristan Agricultural Genetics and Biotechnology Research Institute, Sari, Iran
3. Associate Prof., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4. Graduated PhD Student of Imam Khomeini International University, Researcher in Tabaristan Agricultural Genetics and Biotechnology Research Institute, Sari, Iran